

The stability comparison of purified bee venom and bee venom melittin in aqueous solution

Jung Keun Park^{1, *}, Chang Zhe Shen¹, Choul Goo Kim¹ and Il Kwang Kim²

¹Chungjin Biotech Co., Ltd., F4, 15 Sungan2-gil, Sangrok-gu, Ansan-si, Gyeonggi-do 426-791, Korea

²N. CosmeCeU Co., Ltd., Business Incubator 202, Wonkwang Univ., Iksandae-ro 460, Iksan-si, Jeonbuk 50538, Korea

(Received May 3, 2016; Revised August 24, 2016; Accepted August 24, 2016)

수용액에서 정제봉독 (PBV)과 봉독멜리틴 (BVM)의 안정성 비교

박정근^{1, *} · 신장철¹ · 김철구 · 김일광²

¹(주)청진바이오테크, ²(주)앤 코스메슈, 원광대학교

(2016. 5. 3. 접수, 2016. 8. 24. 수정, 2016. 8. 24. 승인)

Abstract: The stability comparison tests on purified bee venom (PBV) and bee venom melittin (BVM) in different conditions of temperature, solvent, and concentration were studied. High purity BVM (98.2 %) was separated from PBV by prep-HPLC (column, C₄) and used to stability tests in aqueous phase. The stability of the PBV has been increased in the saline solution, while BVM was reduced. In distilled water, the stability of PBV has been reduced, while BVM showed an increasing result. As a result, the appropriate conditions for maintaining the long term stability of BVM were found to be the low temperature (4 °C), distilled water, and concentration (1.0 mg/mL).

요 약: 본 연구는 수용액 상태에서 정제봉독 (purified bee venom, PBV)과 봉독멜리틴 (bee venom melittin, BVM)을 보관하기 위하여 온도, 용매, 농도의 조건에 따른 안정성을 비교 실험한 결과이다. Prep-HPLC (column: C₄)를 이용하여 정제봉독으로부터 98.2%인 봉독멜리틴을 분리하여 사용하였다. 용매에 따른 안정성 실험에서, 생리식염수의 경우 정제봉독은 안정성이 증가되고 봉독멜리틴은 감소되었다. 증류수의 조건에서 정제봉독의 안정성은 감소되었으나 봉독멜리틴은 증가되는 현상이 확인되었다. 봉독멜리틴의 안정성을 장기간 유지하기 위한 최적조건으로는 보관온도 4 °C, 증류수, 시료의 농도는 1.0 mg/mL의 결과를 얻었다.

Key words: Stability, Quantitative analysis, Prep-HPLC, Purified bee venom (PBV), Bee venom melittin (BVM)

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)31-409-3707 Fax : +82-(0)31-409-3709

E-mail : kjp33mtar@biovenom.com, ilkim7475@naver.com

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서 론

봉독이란 꿀벌 (*Apis mellifera* L.)의 독낭세포에서 분비되는 액체로 독낭에 저장되었다가 외부의 자극이나 공격으로부터 종족을 보호하기 위한 방어수단의 물질이다. 무색, 투명, 점성이 있으며 강한 쓴맛이 나는 방향성 물질의 액체이다. 비중은 1.13, pH는 5.2~5.5 이고 물과 산에 쉽게 용해된다.¹ 봉독의 대표적인 효능은 항균효과, 항염증 효과가 있으며² 최근에는 다발성 경화증, 라임병, 만성피로증후군 및 폐암, 유방암, 간암과 같은 암세포의 성장을 억제한다는 연구가 보고되고 있다.³ 봉독은 다양한 성분들로 구성되어 있으며, 현재까지 밝혀진 성분은 약 40여 가지로 활성펩타이드 성분에는 melittin, melittin-F, apamin, secapin, peptide 401 (MCD peptide), tertiapin, protease inhibitor⁴ 등이 있다. 효소성분에는 phospholipase A₂ (PLA₂), hyaluronidase, acid phosphomonoesterase, lyso phospholipase⁵ 등이 있으며 저분자 활성아민류에는 histamine, dopamine, noradrenaline⁶ 등이 있다.

그 중, melittin (Fig. 1)은 봉독의 주요성분이며 1954년에 Neumann과 Habermann에 의해 직접 용혈성 성분으로 처음 발견되었고, 1972년 Habermann에 의해 적혈구 용해시에 세포막 활성이 관찰되었으며⁷ 건조봉독의 40-50%를 구성하고 있다. 특징은 상온에서 흰색 분말 형태이며, 분자량은 2,849 dalton이고 26개의 아미노산으로 구성된 polypeptide이다.⁸ 봉독이 가지고 있는 주요 약리작용 및 생리활성은 melittin으로부터 나오며, 뇌하수체-부신체계를 자극하여 catecholamine과 cortisone 분비를 증가시켜 항염증 작용을 하며,⁹ 리소좀의 세포막을 안정화시켜 항염증¹⁰ 작용을 한다. 또한, 대식세포의 이동을 강하게 억제하고 PLA₂와 상승적으로 작용하여 서로의 활동성을 증가시킨다. PLA₂는 봉독의 10-12%를 구성하고 있으며 melittin과 함께

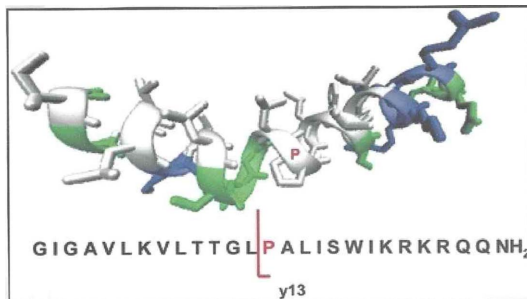


Fig. 1. α -Helix conformation and polypeptide backbone⁸ of melittin.

상호작용하여 강력한 항염증과 진통작용을 하는 것으로 밝혀져 있으며¹¹ hyaluronidase와 함께 강력한 항원성을 가지고 있다.¹² PLA₂는 봉독의 주요 알러지 발생 원인으로 작용하여 두드러기, 가려움증, 구토, 경련 등이 유발될 수 있고, 호흡기 장애가 있을 수 있으므로 임상에서는 신중히 사용해야 하며, PLA₂가 제거된 봉독이 알레르기 반응을 낮출 수 있다는 연구가 보고된바 있다.¹³ 봉독의 임상활용을 위한 보관 안정성에 대하여 분말 상태의 봉독은 냉동상태에서 장기간 보관이 가능하고,¹⁴ pH나 고온에서의 안정성 연구는 보고되었지만,^{15,16} 수용액 상태에서의 연구는 대부분 1일에서부터 7일 이내의 비교적 짧은 기간에만 머물고 있으며, 장기간 보관에 따른 안정성 연구는 보고되지 않은 실정이다. 따라서 본 연구의 목적은 주요 성분들이 함유된 정제봉독 (purified bee venom, PBV)과 이를 2차 분리한 봉독멜리틴 (bee venom melittin, BVM)을 수용액 상태에서 melittin의 함량 변화를 보관온도, 용매, 농도에 따라 일별로 측정함으로써 안정성을 각각 비교하였다. 생물의약품의 경우 대부분 온도, 빛, 산화 같은 요인들에 민감하기 때문에 제품의 유효성과 순도 등 품질을 유지하고 변성을 방지하기 위해 엄격한 조건에서 보관이 필수적이며, 저장방법 및 사용기간의 설정이 필요하다. 식품의약품 안전처의 '생물의약품 안정성시험 가이드 라인'의 일반적 사항들을 적용해서 안정성 실험을 진행하였으며, 봉독을 원료로 한 생물의약품, 봉독약침액, 화장품 원료 제조 및 보관 시 기초정보와 활용방법을 제공하였다.

2. 실험장비 및 방법

2.1. 시약 및 기기

2.1.1. 시약 및 용매

안정성 실험에 사용된 봉독은 국내에서 사육중인 서양꿀벌 (*Apis mellifera* L.)로부터 봉독채취기 ((주) 청진바이오텍, CJ-401, 한국)를 사용하여 채집하였다. 봉독의 주요성분 지표물질은 melittin (from bee venom, Sigma-Aldrich, 미국)과 PLA₂ (from bee venom, Sigma-Aldrich, 미국)를 구입하여 사용하였다. Trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich, 미국), 0.9% 생리식염수 (중외제약) 및 분석, 분리 용매로 사용한 acetonitrile (Avantor, 미국), ethyl alcohol (Burdick & Jackson, 한국), water (삼진화학, 한국)는 HPLC용 등급을 구입하여 사용하였고, water는 사용 전에 filter membrane (Phenomenex, 0.20 μ m, 47 mm nylon)으로 filter 하였다. SDS-PAGE

실험에는 30% acrylamide/bis solution (Bio-Rad, USA), Tris-HCl (Tech&I, BTH-9180-500M), sodium dodecyl sulfate (SDS, Bio-Rad), ammonium persulfate (Bio-Rad), tetramethyl ethylene diamine (TEMED, Bio-Rad)를 구입하여 gel을 만들었고, coomassie brilliant blue G-250 (Bio-Rad), destaining solution (Bio-Rad)은 구입하여 바로 사용하였다. Precision plus protein dual xtra standards (Bio-Rad)을 구입하여 marker로 사용하였으며, 별도로 기술되지 않은 시약들은 가능한 최고 순도의 분석급 또는 이와 동일한 순도의 제품을 사용하였다.

2.1.2. 기기

정제봉독 및 봉독멜리틴의 정량 및 정성 분석을 위한 HPLC system은 Waters (Milford, USA)사의 2695 alliance를 사용하였으며, 검출기로는 Waters 996 photodiode array detector를 사용하였다. Column은 Phenomenex (Seoul, Korea)사의 jupiter preteo 90 Å, C₁₂ (150 × 4.60 mm, 4 μm)를 사용하였다. 봉독멜리틴 분리를 위한 Prep-HPLC system은 Waters (Milford, USA)사의 2525 binary gradient pump를, 검출기로는 Waters 996 photodiode array detector를, fraction collector는 Waters 2767u sample manager를 사용하였다. Column은 YMC (Kyoto, Japan)사의 YMC-pack, C₄ (250 × 20 mm, 10 μm)를 사용하였다. sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 실험에서 mini protein tetra cell과 powerpac supply는 Bio-Rad (Seoul, Korea)사의 기기를 사용하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. 정제봉독 (PBV) 준비

국내에서 사육중인 서양종 꿀벌에서 봉독채취기를 이용하여 채집한 봉독을 사용하였고, 비수용성 성분과 불순물들을 제거하기 위하여 3차 증류수에 충분히 용해시킨 후 여과지를 통해 여과하였다. 이어서 0.45 μm membrane filter와 0.2 μm membrane filter를 이용하여 여과 후, 여과된 봉독을 -56 °C와 -75 °C 범위에서 동결 건조한 후 분말형태의 정제봉독 (PBV)을 제조하여 실험에 사용하였다.

2.2.2. Prep-HPLC를 이용한 봉독멜리틴 (BVM) 분리

전처리된 정제봉독 시료에서 melittin만을 얻기 위해 분말의 정제봉독을 증류수에 녹여 50 mg/mL로 제조하여 Prep-HPLC를 사용하여 Table 1과 같은 조건에서 분리하였다. 용출된 분획들 중 melittin peak만

Table 1. Isolated conditions of bee venom melittin using Prep-HPLC

Pump	Waters 2525 binary gradient pump		
Detector	Waters 996 detector		
Instrument	Fraction collector	Waters 2767u sample manager	
Column	YMC-pack C ₄ (250 × 20 mm, 10 μm)		
Mobile phase	A: 0.2% TFA in water B: 0.22% TFA in ethyl alcohol		
UV absorbance	220 nm		
Column temperature	25 °C		
Injection volume	1,000 °C		
Flow rate	6.0 mL/min.		
Gradient	min	A(%)	B(%)
	Ini.	50	50
	11	50	50
	12	30	70
	30	30	70
	31	50	50
36	50	50	

Table 2. Quantitative analysis conditions of purified bee venom using HPLC

Pump	Waters 2695 alliance		
Detector	Waters 996 detector		
Instrument	Column	Phenomenex Jupiter 4u proteo 90A (C ₁₂ 150 × 4.6 mm, 4 μm)	
Mobile phase	A: 0.2% TFA in water B: 0.22% TFA in acetonitrile		
UV absorbance	220 nm		
Column temperature	25 °C		
Injection volume	20, 25, 30, 35, 40 μL		
Flow rate	1.0 mL/min.		
Gradient	min	A(%)	B(%)
	Ini.	100	0
	20	50	50
	30	100	0

fraction collector로 모았으며 각각의 분획들은 ethyl alcohol와 trifluoroacetic acid를 제거하였다. -75 °C의 온도로 동결 건조하고 분말형태의 봉독멜리틴 (BVM)을 제조하여 실험에 사용하였다.

2.2.3. 정제봉독의 유효성분 함량 측정

정제봉독의 대표적인 유효성분인 melittin과 PLA₂의 정량분석은 지표물질 melittin (순도 ≥92.0%)을 20, 25, 30, 35, 40 μL씩 주입하여 검량곡선을 작성하였으며, Table 2와 같은 HPLC 조건에서 실행하였다.

정제봉독 시료도 증류수에 용해시켜 1.0 mg/mL의

농도로 만들어 분석하였으며, 각 성분 함량은 지표물질의 검량곡선과 각 성분의 peak 면적을 비교하여 아래 식과 같이 계산하였다.

$$\text{함량(\%)} = \frac{\text{지표물질채취량(mg)} \times \frac{\text{지표물질순도(\%)}}{100}}{\frac{\text{검액의 피크면적}}{\text{지표물질의 피크면적}} \times \frac{100}{\text{검체의 채취량(mg)}}}$$

지표물질들의 회수율은 PLA₂ (56.08%) 20 µg, melittin (92.0%) 20 µg에 지표물질 각각 20, 25, 30, 35, 40 µL를 첨가하고 아래 식의 계산법으로 계산하였다.

$$\text{회수율(\%)} = \frac{\text{측정값} - \text{지표물질량(20 µg)}}{\text{지표물질첨가량(20 µg)}} \times 100$$

2.2.4. SDS-PAGE pattern

정제봉독 및 봉독멜리틴 시료들을 다음조건에 따라 처리하여 SDS-PAGE 방법으로 분석하였다. 20%의 gel 조성물을 만들기 위해 고정된 유리 플레이트에 약 10 mL (dH₂O 700 µL, 30% acrylamide mix 6.6 mL, 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 2.5 mL, 10% SDS 100 µL, 10% ammonium persulfate 100 µL, TEMED 4 µL)를 분주한다. 평형을 맞추기 위해 물을 약 1~2 mL정도 가하여 separating gel을 굳힌다. Separating gel이 굳으면 물을 제거하고 staking gel 조성물 약 5 mL (dH₂O 3.4 mL, 30% acrylamide mix 830 µL, 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 630 µL, 10% SDS 50 µL, 10% ammonium persulfate 50 µL, TEMED 5 µL)을 분주 후, gel이 굳기 전에 comb를 끼워 굳힌다. Staking gel까지 굳으면 comb를 제거하여 SDS-PAGE gel을 완성시킨다. 분석하고자 하는 시료와 완충액 (Laemmli 2x concentrate, Sigma)을 1:1 비율로 혼합하고, 90 °C의 water bath에서 5분 동안 중탕시킨다. Gel의 comb에 marker를 5 µL, 샘플을 30 µL씩 로딩하고, gel을 SDS-PAGE 탱크에 끼워서 running buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3)를 채워준다. SDS-PAGE의 power supply를 통하여 staking gel에서 60 V로 약 30분 동안 전개시키고, separating gel에서 100 V로 약 60~90분 동안 전개시킨다. 시료의 성분은 power supply에서 흘러주는 전류에 따라 분자량 별로 분리되고, coomassie brilliant blue R-250 염료와 destaining solution으로 염색 후 탈색 처리한다.

2.2.5. 수용액에서의 안정성 실험 방법

안정성 실험은 초기의 melittin peak 평균면적값 대비 지정된 날짜의 시료를 취하여 melittin peak 평균면

적값의 변동률을 비교하여 아래와 같은 계산법으로 계산하였으며, 보관온도, 용매종류, 시료농도에 대하여 실험을 수행하였다.

$$\text{안정성(\%)} = \frac{\text{초기의 melittin peak 평균면적값} - \text{지정된 날짜의 melittin peak 평균면적값}}{\text{초기의 melittin peak 평균면적값}} \times 100$$

1) 온도에 대한 안정성 실험

분말 상태의 정제봉독과 봉독멜리틴을 멸균증류수에 각각 용해시켜 1.0 mg/mL로 만들었으며, 멸균한 투명유리병에 담아 고무마개하여 상온과 저온 (4 °C) 보관하였다. 상온보관에서는 초기에서 30일에 걸쳐 1일 간격으로 1회용 주사기로 1.0 mL 취하여 HPLC 분석하였으며, 저온보관에서는 초기에서 30일에 걸쳐 3일 간격으로 1회용 주사기로 1.0 mL 취하여 HPLC 분석하였다.

2) 용매에 대한 안정성 실험

분말 상태 정제봉독과 봉독멜리틴을 각각 멸균증류수와 0.9% 생리식염수에 용해시켜 1.0 mg/mL로 만들었다. 멸균한 투명유리병에 담아 고무마개로 막아 상온에서 보관하였다. 실험기간은 초기에서 30일에 걸쳐 1일 간격으로 1회용 주사기로 1.0 mL 취하여 HPLC 분석하였다.

3) 농도에 대한 안정성 실험

분말 상태 정제봉독과 봉독멜리틴을 각각 0.1 mg/mL 농도와 1.0 mg/mL 농도로 멸균증류수에 용해시켰다. 멸균한 투명유리병에 옮기고 고무마개로 막아 상온에서 보관하였으며 실험기간은 초기에서 100일에 걸쳐 1일 간격으로 1회용 주사기로 1.0 mL 취하여 HPLC 분석하였다.

2.2.6. 통계처리

모든 실험은 3회 반복 실시하였고 실험에 대한 평균과 표준편차 (mean ± SD)로 나타내었다. 통계분석은 GraphPad Prism 4.0 프로그램을 사용하였고, 유의차 검정은 평균 표준편차 분석을 한 후 p < 0.05 수준을 따라 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 정제봉독과 봉독멜리틴의 정량분석

지표물질 PLA₂와 melittin의 표준용액을 20, 25, 30, 35, 40 µL씩 취하고 220 nm에서 측정하여 표준검정곡선을 작성하였다. Fig. 2(a)에서 지표물질 PLA₂

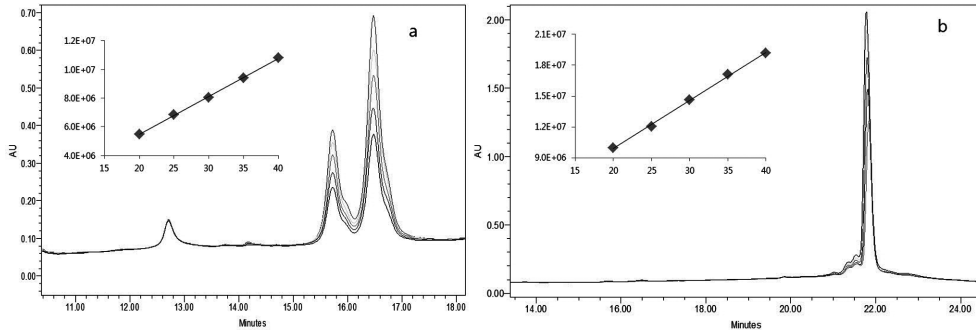


Fig. 2. HPLC chromatogram of standard calibration curve. (a) PLA₂, (b) melittin

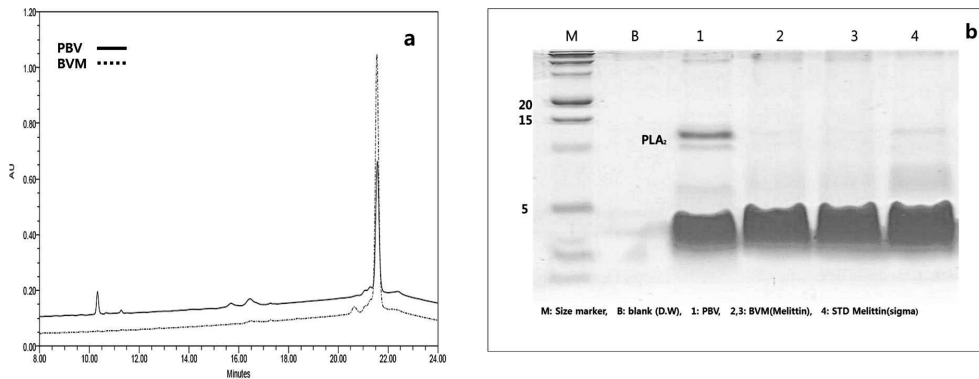


Fig. 3. Identification of PBV and BVM. (a) HPLC, (b) SDS-PAGE (20 %)

직선은 $y=402112x+222897$, 상관계수 (R^2)는 0.9994, 머무름 시간은 16.5분이었고, 평균회수율은 98.4%, RSD: ± 0.007 ($n=3$)이었다. Fig. 2(b)에서 지표물질 melittin 직선은 $y=476095x+200006$, 상관계수 (R^2)는 0.9984, 머무름 시간은 21.8이었고, 평균회수율은 99.8%, RSD: ± 0.0054 ($n=3$)이었다.

이들 표준용액 HPLC와 표준검정곡선에 대하여 정제봉독과 봉독멜리틴의 HPLC와 봉독멜리틴의 머무름 시간과 peak를 비교하였다. 그 결과, 정제봉독의 시료는 PLA₂: 13.08 %, melittin: 59.73 %임을 확인하였고, 봉독멜리틴 시료에서는 PLA₂ 미검출, melittin: 98.2 %임을 확인하였다. 정제봉독과 봉독멜리틴에 대하여 비교 분석한 결과를 Fig. 3(a)와 (b)에 나타내어 보였다. Fig. 3(b)의 SDS-PAGE에서 지표물질용으로 구입한 melittin과 자체정제 봉독멜리틴을 비교하면, 지표물질 (4)에서는 PLA₂ 밴드가 소량 확인되고 있으나, 봉독멜리틴(2,3)에서는 확인되지 않는 것으로 보아 자체정제 봉독멜리틴 (BVM)이 지표물질용으로 구입한 melittin보다 순도가 높은 것을 확인할 수 있었다.

3.2. 수용액에서의 정제봉독 (PBV)과 봉독멜리틴 (BVM)의 안정성 비교

3.2.1. 시료의 온도별 안정성 비교

정제봉독과 봉독멜리틴을 멸균증류수에 용해시키고 보관 온도에 따라 안정성 여부를 측정하여 Fig. 4(a)와 (b)에 보였다. 상온에서 보관한 정제봉독 수용액은 melittin이 쉽게 변환되어 8일 차에 함량이 모두 손실하였으나, 대조적으로 봉독멜리틴 수용액에서는 30일차에서도 melittin 함량이 약 77 % 정도로 유지되는 것이 확인 되었다. Fig. 4(b)의 저온 (4 °C)에서 보관한 정제봉독 수용액의 melittin 함량은 30일차에 약 18 % 감소하였고, 봉독멜리틴 수용액에서는 약 3 % 감소한 것을 확인하였다. 따라서, 상온상태의 보관보다 저온상태에서 보관함으로써 정제봉독 및 봉독멜리틴 모두 안정성을 높일 수 있었다. 결과적으로, 수용액 상태의 상온 및 저온보관 모두에서 봉독멜리틴이 정제봉독보다 높은 안정성을 갖는 것이 확인되었고, 봉독물질 취급에서 저온조건의 중요함을 알았다.

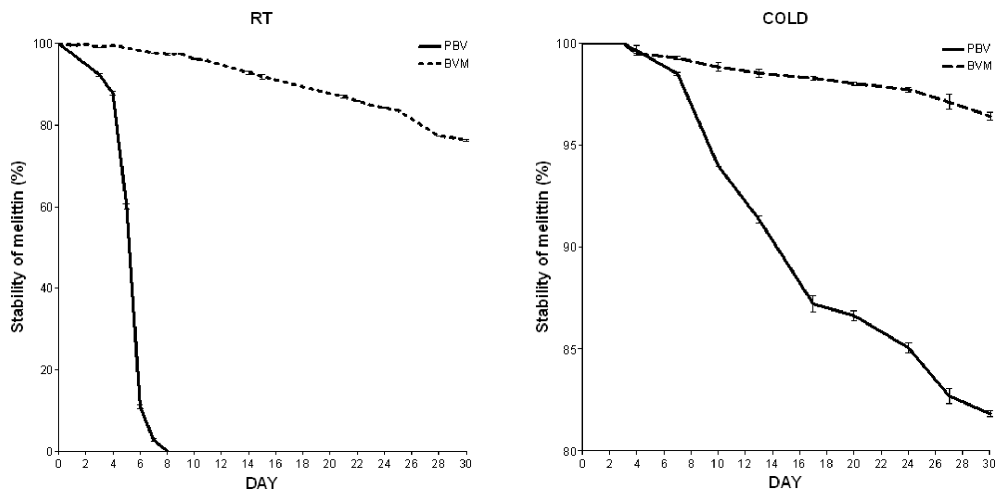


Fig. 4. Stability of PBV and BVM for 30 days. (a) room temperature storage, (b) cold (4 °C) storage

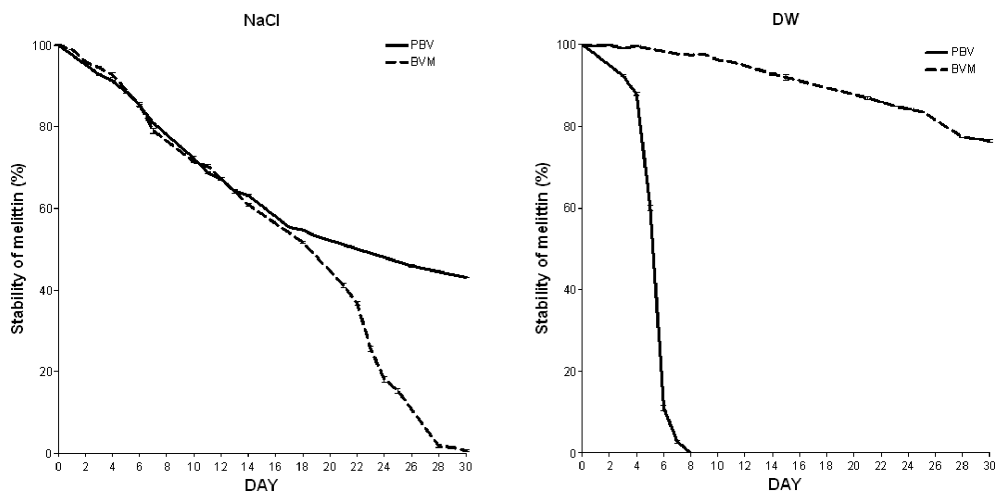


Fig. 5. Stability of PBV and BVM for 30 days. (a) 0.9 % NaCl storage, (b) D.W storage

3.2.2. 시료의 용매별 안정성 비교

정제봉독과 봉독멜리틴을 용해시킨 수용액의 조건에 따라 안정성 여부를 확인하여 결과를 Fig. 5(a)와 (b)에 보였다. Fig. 5(a)의, 0.9% 생리식염수 조건에서, 정제봉독의 melittin 함량은 6일 차에 약 20%, 20일 차에 48%, 30일 차에는 57% 감소한 것을 확인하였다. 이와 대조적으로 봉독멜리틴은 18일차까지 정제봉독과 비슷한 비율로 감소하다가 이후 감소속도가 빨라지고 30일차에서 melittin 함량이 모두 소실되는 것을 확인하였다.

Fig. 5(b)에서 멸균증류수에 보관한 정제봉독의 melittin은 감소속도가 매우 빨라 8일차에 모두 소실되었으나 봉독멜리틴은 30일차에서도 melittin 함량이

약 77% 유지되는 것을 확인하였다. 결과적으로, 정제봉독에서의 생리식염수는 안정성에 기여하는 역할을 하고, 멸균증류수는 안정성을 감소시켰으며, 이와 반대로 봉독멜리틴에서의 생리식염수는 안정성을 크게 저해하는 역할을 하고, 멸균증류수는 안정성에 기여하는 역할을 하는 것으로 나타났다. Venkatesu¹⁷에 따르면 이러한 결과는 순도가 높은 봉독멜리틴 (BVM) 펩타이드 분자의 골격구조 자유에너지가 식염수층으로 이동하여 생리식염수의 이온성분이 펩타이드 아미노산들을 불안정하게 만들기 때문인 것으로 설명할 수 있다. 한편, melittin이 수용액에서 안정한 것은 Liao¹⁸의 연구결과와 같이 melittin 분자들이 밀착된 사합체의 구조로 분자회합하여 안정화되기 때문인 것으로

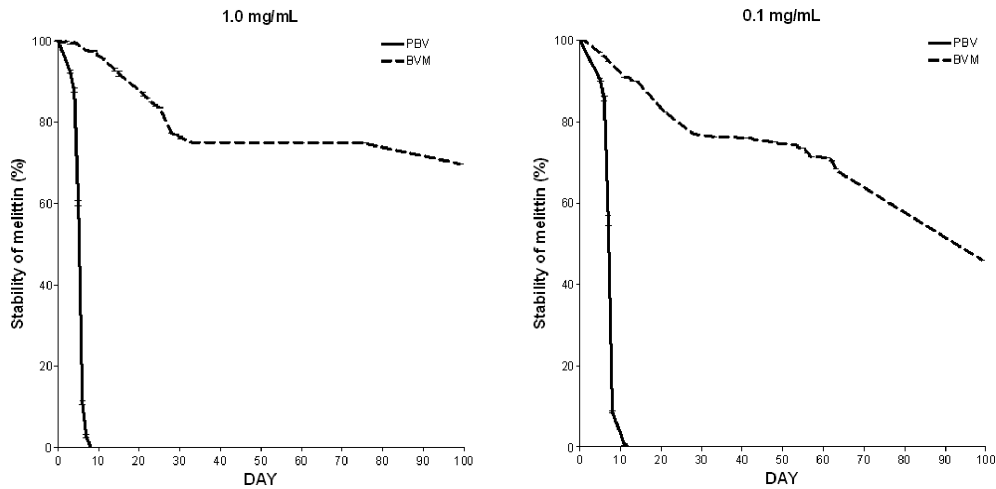


Fig. 6. Stability of PBV and BVM for 100 days. (a) 1.0 mg/mL storage, (b) 0.1 mg/mL storage

설명할 수 있다.

3.2.3. 시료의 농도별 안정성 비교

정제봉독과 봉독멜리틴을 멸균증류수에 용해시키고 농도에 따라 안정성 여부를 측정하여 그 결과를 Fig. 6(a)와 (b)에 보였다. Fig. 6(a)의 1.0 mg/mL 농도에서 봉독멜리틴은 100일차에서 30% 정도가 감소하였으며, 정제봉독은 8일차에 모두 소실된 되었다. Fig. 6(b)의 0.1 mg/mL 농도에서도 1.0 mg/mL 농도와 유사한 경향으로 봉독멜리틴은 100일차에서 54% 감소하였지만, 정제봉독은 10일차에 모두 분해되었다. 봉독멜리틴과 정제봉독 농도차이에 따른 영향에서는 1.0 mg/mL 농도에서 0.1 mg/mL 농도보다 각각 23%와 4% 정도로 높은 안정성을 나타내었다.

결과적으로, 증류수용액에서 봉독멜리틴이 정제봉독보다 안정성이 높았으며, 상대적으로 낮은 농도 (0.1 mg/mL)보다 높은 농도 (1.0 mg/mL)에서 안정성이 높은 결과를 보였다.

4. 결 론

수용액 상태에서 주요 성분들이 함유된 정제봉독 (PBV)과 Prep-HPLC를 이용하여 얻어진 봉독멜리틴 (BVM)의 안정성을 각각 비교하였다. Prep-HPLC를 이용하여 melittin이 98.2%인 고순도 봉독멜리틴을 분리하였고, 안정성 항목은 온도, 용매, 보관농도에 따라 melittin 함량의 변화를 일별로 측정하였다. 온도에 따른 안정성 실험에서는 봉독멜리틴은 30일차

에 상온에서 23%, 저온에서 3% 감소하였다. 정제봉독은 8일차에 상온에서 100% 분해되었고, 저온에서 30일차에 18% 감소하였다. 봉독멜리틴이 정제봉독보다 상온 및 저온 모두에서 비교적 높은 안정성을 보였다. 용매에 따른 안정성 실험에서 생리식염수는 정제봉독의 안정성을 유지시키는 역할을 하고, 멸균증류수는 저해하였으며, 이와 반대로 봉독멜리틴에서 생리식염수는 안정성에 저해하는 역할을 하고, 멸균증류수는 유지하는 역할을 하였다. 농도에 따른 안정성 실험에서는 봉독멜리틴이 1.0 mg/mL과 0.1 mg/mL 모두 정제봉독보다 안정성이 높았으며, 상대적으로 낮은 농도 0.1 mg/mL보다 진한 농도 1.0 mg/mL에서 정제봉독은 4%, 봉독멜리틴은 23% 더 높은 안정성을 갖는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 볼 때 봉독멜리틴이 정제봉독보다 더 높은 안정성을 갖는 것을 알았으며, 생체에 바로 투여할 수 있는 장기간 안정성을 유지하기 위해서는 낮은 온도 (4 °C), 멸균증류수, 1.0 mg/mL의 조건이 적절한 결과를 얻었다.

이로써, 용매에 따른 안정성 실험을 통하여 생리식염수가 봉독멜리틴의 안정성을 감소시키는 메커니즘을 설명할 수 없었지만, 봉독멜리틴을 원료로 한 의약품 제조 및 보관 시 활용 가능한 기초정보를 확보하였다.

감사의 글

본 연구는 2014년 중소기업청의 기술혁신개발사업

의 지원을 받았으며 김일광 교수님의 도움을 받아 이루어졌음에 감사드립니다.

References

1. S. M. Han, K. G. Lee, J. H. Yeo, H. Y. Kwon, H. J. Baek and K. K. Park, *J. Med. Plants. Res.*, **4**(6), 459-464 (2010).
2. M. H. Kim, *Education Plan of Korea*, 67-141 (1992).
3. S. T. Kim, J. Y. Hwang, M. S. Sung, S. Y. Je, D. R. Bae, S. M. Han and S. H. Lee, *Korean J. Vet. Serv.*, **29**(1), 19-26 (2006).
4. Z. J. Kokot and J. Matysiak, *Chromatographia*, **69**, 1401-1405 (2009).
5. R. V. Ameratunga, R. Hawkins, R. Prestidge and J. Marbrook, *Pathology*, **27**(2), 157-160 (1995).
6. H. R. Chmielewska and T. Szezesna, *J. Apic. Sci.*, **48**, 103-109 (2004).
7. H. K. Ko and K. R. Kwon, *Publication of KyungHee University*, 106-107 (2003).
8. T. C. Terwilliger and D. Eisenberg, *J. Biological Chem.*, **257**(11), 6016-6022 (1982).
9. J. D. Dunn and J. J. Killion, *Acta Endocrinol.*, **119**(3), 339-344 (1988).
10. H. N. Kim and S. S. Nam, *Korean Inst. of Herbal Acupuncture.*, **3**(1), 65-87 (2000).
11. J. S. Choi, J. W. Park and M. S. Oh, *Daejeon University Orient. Med. Symp.*, **15**(1), 141-160 (2006).
12. W. Neumann, E. Habermann and G. Amend, *Naturwissenschaften*, **39**, 286-287 (1952).
13. J. S. Lee, J. Y. Lee, K. R. Kwon and H. C. Lee, *J. Pharmacopunct.*, **9**(3), 61-77 (2006).
14. J. D. Lee, *J. Korea Orient. Med.*, **21**(3), 3-8 (2000).
15. M. Cho, S. Han, J. Kim, J. Yeo, I. Hong, S. Woo and K. Lee, *J. Seric. Entomol. Sci.*, **52**(1), 6-9 (2014).
16. Y. Miura, *Eur. Biophys. J.*, **41**, 629-636 (2012).
17. P. Venkatesu, M. J. Lee and H. M. Lin, *Biochem. Eng. J.*, **32**, 157-170 (2006).
18. C. Liao, M. S. Selvan and J. Zhao, etc., *J. Phys. Chem. B.*, **119**(33), 10390-10398 (2015).